

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Attorney Docket No.: 24741-152

Applicants: Fritz GRUNERT *et al.*

Appl. No.: 09/807,509

Examiner: Unassigned

Filing Date: June 25, 2001

Group Art Unit: Unassigned

Title: PROCESS FOR PREPARING ANTIBODIES AGAINST A POLYPEPTIDE
IN WHICH THE NUCLEIC ACID ENCODING THE PEPTIDE IS KNOWN
(AS AMENDED)

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Director of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

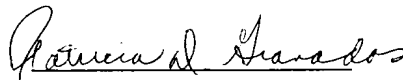
The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed. In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application:

German Patent Application No. 198 52 800.0 filed November 16, 1998.

Also filed concurrently herewith is a verified English language translation of said original foreign application.

Respectfully submitted,

August 2, 2001
Date


Patricia D. Granados
Reg. No. 33,683

Heller Ehrman White & McAuliffe LLP
1666 K Street, N.W., Suite 300
Washington, D.C. 20006
Telephone: (202) 912-2000
Facsimile: (202) 912-2020

PATENT TRADEMARK OFFICE



26633

PATENT TRADEMARK OFFICE

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 52 800.0

Anmeldetag: 16. November 1998

Anmelder/Inhaber: GENOVAC AG, Freiburg/DE

Erstanmelder: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
Freiburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen ein
Polypeptid, von dem die kodierende Nukleinsäure
bekannt ist

IPC: C 07 K 16/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 21. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Faust'.

Faust

LEDERER, KELLER & RIEDERER

Patentanwälte - European Patent Attorneys

DR. A. VAN DER WERTH
(1934 - 1974)

DR. FRANZ LEDERER
Dipl.-Chem. München

DR. GÜNTER KELLER
Dipl.-Biol. München

DR. MICHAEL BEST
Dipl.-Chem. München

ANTON FRH. RIEDERER v. PAAR
Dipl.-Ing. Landshut

80538 MÜNCHEN
Prinzregentenstraße 16
Telefon (089) 21 23 99 0
Telefax (089) 21 23 99 22
E-Mail lederer_keller@compuserve.com

16. Nov. 1998

Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg
Hugstetter Str. 49

79106 Freiburg

**Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen ein Polypeptid,
von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist**

In der Molekularbiologie stellt sich aufgrund der enormen Fortschritte der Sequenzierungsmöglichkeiten von Nukleinsäuren häufig das Problem, daß die genetische Information für ein Polypeptid bzw. Protein bekannt ist und, daß andererseits dieses Polypeptid bzw. Protein nicht in reiner Form vorliegt. Durch das sogenannte Human Genome Project werden laufend Nukleotidsequenzen veröffentlicht, häufig ist aber völlig unklar, welche Funktion die von diesen Genen kodierten Polypeptide bzw. Proteine haben.

Für die praktische Anwendung und Auswertung dieser wissenschaftlichen Erkenntnisse ist es in der Regel sehr hilfreich, wenn diese Proteine durch geeignete Antikörper nachgewiesen werden können. Durch den Einsatz derartiger Antikörper können entweder die Proteine gereinigt werden oder

es ist beispielsweise möglich, die Lokalisation der Proteine in Geweben und Zellen zu bestimmen.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper bereitzustellen, die gegen solche Polypeptide bzw. Proteine gerichtet sind, von denen zwar die Nukleotidsequenz bekannt ist, die aber nicht in angereicherter oder gar gereinigter Form vorliegen.

Herkömmlicherweise werden Antikörper so hergestellt, daß zunächst die Proteine aus den Zellen oder dem Gewebe gereinigt werden oder mit Hilfe von Bakterien oder in Insektenzellen oder Säugerzellen rekombinant hergestellt werden und, daß diese Proteine dann für die Immunisierung von Tieren verwendet werden. Diese Verfahren sind häufig sehr aufwendig und langwierig. Im Falle der Herstellung in Bakterien sind die so hergestellten Proteine häufig nicht identisch mit den natürlich vorkommenden Proteinen, da sich die Sekundärstruktur von den nativen Proteinen unterscheiden kann und da Bakterien nicht über dieselben posttranslationalen Modifikationsmechanismen verfügen, die bei eukaryotischen Organismen vorhanden sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine

Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und

- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht im wesentlichen aus drei Schritten. Einerseits wird die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert (Schritt a)). Da das mit Hilfe des Vektors exprimierte Polypeptid in der Wirtszelle in der Regel nur in einer verhältnismäßig geringen Konzentration vorliegt, wird erfindungsgemäß der eingesetzte Vektor mit einer Nukleotidsequenz versehen, die für eine Auffindungssequenz (tag-Sequenz) kodiert. Diese tag-Sequenz ist mit der für das Polypeptid kodierenden Sequenz verbunden, was dazu führt, daß das exprimierte Polypeptid zum Beispiel am C-Terminus diese Auffindungspeptidsequenz aufweist.

In dem unabhängig von Schritt a) durchgeführten Schritt b) wird die für das Polypeptid kodierende DNA in ein geeignetes Tier eingebracht und dort zur Expression gebracht. Die erfindungsgemäß verwendete genetische Immunisierung ermöglicht die direkte Bildung von Antikörpern in einem Wirtstier.

Bei dieser Methode der Herstellung von Antikörpern wird gereinigte DNA, die die genetische Information für das zu untersuchende Protein und geeignete Steuerelemente enthält, direkt in den für die Antikörperproduktion vorgesehenen Organismus (Maus, Kaninchen, etc.) injiziert. Die DNA wird von Zellen des Empfängerorganismus aufgenommen und das Protein, in nativer Form (d.h. mit korrekten posttranslationalen Modifikationen) exprimiert. Das für den Empfängerorganismus fremde Protein veranlaßt das Immunsystem, gegen das Fremdantigen gerichtete Antikörper zu produzieren (humorale

Immunantwort). Diese Methode ist bereits erfolgreich zur Produktion von hochaffinen, native Proteine erkennenden monoklonalen Antikörpern eingesetzt worden

Die für die genetische Immunisierung in Schritt b) zur Herstellung der gewünschten Antikörper eingesetzten Expressionsvektoren sollen auch *in vitro* zur Produktion des Zielproteins verwendet werden. Durch transiente Transfektion (Elektroporation, Lipofektion, etc.) werden die Expressionsvektoren in geeignete Zielzellen, insbesondere Säugerzellen eingeschleust, die dann das gewünschte Protein synthetisieren. Diese Zellen (intakt oder nach Lyse mit geeigneten Puffern) bzw. Medienüberstände (bei sezernierten Proteinen) sollen dazu dienen, den Protein-erkennenden Antikörper durch FACScan-Analysen (im Falle von zellständigen Proteinen) oder ELISA nachzuweisen.

Wenn ein fremdes Polypeptid in einer Wirtszelle exprimiert wird, kann das exprimierte Polypeptid üblicherweise durch Verwendung einer Sekretionssequenz oder Leadersequenz nach außen geschleust werden. In diesen Fällen ist es wichtig, daß das exprimierte und sezernierte Polypeptid ein Auffindungssignal aufweist, damit das Polypeptid aus dem Medium isoliert werden kann. Wenn aber das Polypeptid nicht nach außen geschleust wird, sondern an der Oberfläche der Zellmembran verbleibt, ist eine zusätzliche Auffindungssequenz nicht unbedingt erforderlich. In diesem Fall übernimmt diejenige Stelle des Polypeptids, die für die Verankerung zwischen Polypeptid und Zelle verantwortlich ist die Funktion der Auffindungssequenz. Da in diesem Fall das exprimierte Polypeptid mit der Zelle verbunden bleibt, können die gebildeten Antikörper durch Bindung an das Polypeptid und nachfolgender Reaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durch FACScan-Analysen nachgewiesen werden. Als Alternative ist auch ein Zell-ELISA möglich, bei dem die gebundenen Antikörper über einen mit einem Enzym gekoppelten

Sekundärantikörper und einer geeigneten Substratreaktion detektiert werden.

Im Falle von sezernierten Proteinen (ggf. auch bei intrazellulär exprimierten Proteinen) ist es nötig, eine Auffindungssequenz (*tag*) dem Antigen rekombinant anzuhängen. Diese *tag*-Sequenz erlaubt es, mit Hilfe von mit ihr interagierenden, an eine feste Matrix gebunden Substanzen (z.B. die *tag*-Sequenz erkennende Antikörper; im Falle der His₆-*tag*-Sequenz geeignete komplexierte Ni²⁺-Ionen), das Protein aus dem Zellüberstand bzw. Zellysate herauszufischen. Als *tag*-Sequenz kommen insbesondere kurze und/oder wenig immunogene Peptidsequenzen in Frage. Als wenig immunogene *tag*-Sequenzen können (für die Herstellung von Antikörpern in Mäusen) auch Mausproteine dienen, die stimulierend auf die Antikörperproduktion wirken (z.B. GM-CSF, IL-4, IL-10 etc.) und gleichzeitig als *tag* fungieren können. Solche *tags* haben den Vorteil, aufgrund der Toleranz des immunisierten Tiers gegenüber diesen Selbstproteinen keine Immunantwort zu entwickeln. Falls die Bildung der die *tag*-Sequenz des rekombinanten Proteins erkennenden Antikörper nicht verhindert werden kann, können diese mit Hilfe von Konstrukten identifiziert werden, die für irrelevante, mit einem identischen *tag* versehene Proteine kodieren.

Das immobilisierte, durch transiente Transfektion hergestellte Protein dient nun dazu, aus dem Serum bzw. Hybridomkulturüberstand (bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern) die es erkennenden Antikörper zu binden. Der Nachweis der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgt dann über enzymgekoppelte Anti-Antikörper (Nachweisantikörper), die über eine spezifische Substratumsetzung, in der Regel photometrisch, quantifizierbar sind. Die Spezifität und Sensitivität des Nachweissystems kann bei Verwendung von Peptid-*tags* bedeutend erhöht werden, wenn als Fängerantikörper F(ab)₂-Fragmente des anti-*tag*-Antikörpers und als

Nachweisantikörper ein Fc-Region-erkennender Antikörper verwendet wird. Durch diese Konfigurierung des ELISA wird eine Kreuzerkennung des Fängerantikörpers ausgeschlossen.

Der für das Polypeptid kodierende Vektor kann am C-terminalen Ende der Auffindungssequenz eine Polyadenylierungssequenz aufweisen, die für die Stabilisierung einer eukaryotischen mRNA da ist.

Damit eine Expression des Polypeptids in der Wirtszelle stattfindet verfügt der Vektor üblicherweise über einen Promotor, wobei bevorzugt starke Promotoren verwendet werden. Als Beispiele können der Promotor des Elongationsfaktors 1α oder der Promotor des Cytomegalovirus genannt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure direkt in ein Tier eingebracht um dort Antikörper gegen das Polypeptid zu erzeugen. In bevorzugter Form liegt die dazu verwendete DNA in Form eines Vektors vor, der so gewählt wird, daß er gleichzeitig für die beiden Schritte a) und b) verwendet werden kann. Die Einführung der für das Polypeptid kodierenden DNA erfolgt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform durch die Verwendung einer sogenannten gene gun. Bei der gene gun werden mikroskopisch kleine Goldpartikel mit der DNA, bevorzugt der Vektor bzw. Plasmid-DNA umhüllt und auf die rasierte Haut des Versuchstieres geschossen. Dabei dringen die Goldpartikelchen in die Haut ein und die an ihnen aufgebrachte DNA wird in dem Wirtstier exprimiert. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Labortiere, wie Maus, Ratte oder Kaninchen verwendet.

Um eine stärkere Antikörperbildung zu erzielen, werden in einer bevorzugten Ausführungsform zugleich mit der für das Polypeptid kodierenden DNA auch sogenannte genetische Adjuvantien appliziert. Hierbei handelt es sich um Zytokine (wie z.B. GM-

CSF, IL-4, IL-10) exprimierende Plasmide, die die humorale Immunantwort in den Labortieren stimulieren.

Insbesondere wenn es sich bei dem verwendeten Labortier um eine Maus oder Ratte handelt, bietet sich die Bildung von Hybridomazellen an. Die immunisierten Mäuse werden geopfert, Milzzellen werden isoliert und mit Tumorzellen fusioniert und anschließend werden solche Klone selektioniert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper sezernieren.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform werden bei Schritt a) die zu untersuchenden Polypeptide von den Wirtszellen sezerniert. Da mit den Polypeptiden ein Auffindungssignal verbunden ist, können die gesuchten Polypeptide dadurch isoliert werden, daß eine Bindung zwischen dem Auffindungssignal (tag-Sequenz) und einem geeigneten Liganden gebildet wird. Die tag-Sequenz ist vorzugsweise an einer festen Phase gebunden. Hierbei kann es sich um die Wände von Mikrotiterplatten, Gelkügelchen oder auch magnetische Kügelchen (sogenannte magnetic beads) handeln. Die magnetic beads haben den Vorteil, daß die das exprimierte Polypeptid enthaltende Lösung mit den magnetic beads leicht gemischt werden kann. Die magnetic beads weisen einen Liganden (bspw. Antikörperfragmente) auf, der an die tag-Sequenz bindet. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes können dann die magnetic beads angereichert werden. Durch Wahl geeigneter Bedingungen kann dann das gesuchte Polypeptid von den magnetic beads wieder eluiert werden, wenn die Antikörper angereichert werden sollen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch solche Antikörper, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein)

a) Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung

Es wurde ein Expressionskonstrukt gewählt, das auf dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) basiert. Bei diesem Vektor wird die cDNA unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors exprimiert. Es können jedoch auch andere, bevorzugt starke, meist ubiquitär aktive Promotoren (z.B. der Promotor des Elongationsfaktor 1 α [EF-1 α]-Gens) Verwendung finden. In die *Bam*HI/*Eco*RV-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne von *thyroid peroxidase* (TPO)-kodierende cDNA-Bereich des Menschen (2602 bp; 859 Aminosäuren) einkloniert und am 3'-Ende noch mit einer für ein His₆-tag-kodierende Region und einem nachfolgenden Stopkodon versehen (TPO sol.-His-pcDNA3). Die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* vermehrt und mit Hilfe eines Qiagen-Plasmidisolierungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

b) Genetische Immunisierung von Mäusen

Für die genetische Immunisierung gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche DNA-Applikationsverfahren. Die intramuskuläre Injektion oder die intrakutane Applikation mit Hilfe Gasdruck-beschleunigter mikroskopisch kleiner, mit Plasmid-DNA umhüllter Goldpartikel (*gene gun*). Für das Beispiel verwendeten wir das *gene gun*-Verfahren. Dazu wurden 200 μ g TPO sol.-His-pcDNA3-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zur genetischen Immunisierung wurde bei fünf Mäusen nach Narkotisierung (intraperitoneal) mit 110 μ l Ketamin/Xylazin (100 mg/kg/16 mg/kg) das Bauchfell (ca. 4 cm²) mit parfümfreier Enthaarungscreme (Veet) entfernt und zweimal mit der *gene gun*

(Helios Gene Gun; Bio-Rad) beschossen. Pro "Schuß" wurden 1 µg Plasmid-DNA appliziert. Nach 19 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 14 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

Beispiel 2

Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins

Zum Nachweis der spezifischen, durch die genetische Immunisierung gebildeten Antikörper muß das vom Expressionsplasmid kodierte Protein hergestellt werden. Um das Protein in nativer Form (ähnlich wie im immunisierten Tier) zu erhalten, wurde das Expressionskonstrukt durch Transfektion in BOSC23-Zellen [Pear *et al.*, (1993) PNAS, 84, 8392-8396] gebracht. Bei den BOSC23-Zellen handelt es sich um eine modifizierte Adenovirus 5-transformierte humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293), die sehr gut transient transfizierbar ist. Die Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturschalen ausplattiert, so daß sie tags darauf eine 80%ige Konfluenz erreichten. Sie wurden dann dreimal mit je 2 ml serum- und antibiotikafreiem *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)-Medium gewaschen und mit 2 µg Expressionplasmid/10 µl Lipofectamin (Life Technologies, Eggenstein) in 1 ml serum- und antibiotikafreiem DMEM-Medium versetzt. Die DNA/Lipofektamin/Medium-Mischung wurde zuvor in einem Polystyrolgefäß zusammenpipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ wurden 2 ml DMEM/20% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. 24 h nach Transfektion (entspricht dem Zeitpunkt der DNA-Zugabe) wurde das Medium durch 5 ml DMEM/5% FCS ersetzt. Nach weiteren 48 h (72 h nach Transfektion) wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

Beispiel 3

Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt kodierte Protein gerichtet sind

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten His₆-tag-Protein (TPO sol.-His) an Nickelchelat-Mikrotiterplatten (DUNN, Asbach) wurden die Vertiefungen mit je 200 µl Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe oben) bzw. eines mock-transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes über Nacht bei 4°C inkubiert, dann viermal mit Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl) und zweimal mit Puffer B (phosphate buffered saline (PBS), 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation mit 300 µl 3 % Rinder-Serumalbumin (BSA)/PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und die Waschungen mit Puffer A und B wiederholt. Die Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurden 1:100 mit Puffer B verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Mäuseseren wurden in die Vertiefungen der Nickelchelat-Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je viermal mit Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20), zweimal mit Puffer B gewaschen und anschließend mit 100 µl 1:2000 mit Puffer B verdünnten Kaninchen anti-Maus-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Vertiefungen viermal mit Puffer C, zweimal mit Puffer B gewaschen, mit je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und in einem ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der hier vorgestellten Erfindung wurden die spezifischen, gegen TPO gerichteten Antikörper "klassisch" mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen

TPO-Antikörper-ELISAs (Varelisa TPO Antibodies; Pharmacia-Upjohn, Freiburg) nachgewiesen. Der Nachweis von anti-TPO-Antikörper erfolgt in diesem Testsystem durch gereinigtes rekombinantes TPO. Der anti-TPO-Antikörpergehalt der Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurde in einer Verdünnung von 1:100 nach Vorschrift des Herstellers bestimmt.

Ergebnisse:

Bei allen 5 mit TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierten Mäusen konnten, im Vergleich zu den Präimmunseren, bei einer Verdünnung von 1:100 eindeutig anti-TPO-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse mit Hilfe von gereinigtem TPO-Protein (Varelisa TPO Antibodies-Nachweissystem).

Maus	Optische Dichte $\lambda_{500\text{nm}}$	
	Präimmunserum	Immunserum
GV1	0,09	2,53
GV2	0,06	1,97
GV3	0,07	1,13
GV4	0,08	1,63
GV5	0,08	0,60

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Nachweissystems wurde beispielhaft das Präimmun- und Immunserum von zwei Mäusen untersucht. Ausgewählt wurde die Maus mit der höchsten (GV1) und die Maus mit der niedrigsten anti-TPO-Antikörperkonzentration (GV5) [siehe Tabelle 1]. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, können bei einer Serumverdünnung von 1:100 bei beiden Mäusen eindeutig anti-TPO-Antikörper im Immunserum nachgewiesen werden, während das Präimmunserum keine Reaktion zeigte. Bei einer Verdünnung von 1:500 konnten in den Immunseren keine anti-TPO-Antikörper mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse mit Hilfe von durch transiente Expression erzeugtem TPO sol.-His-Protein.

Serum oder Puffer	Verdünnung mit Puffer A	Optische Dichte	
		TPO sol.-His	Medium
präimmun	1:100	0,17	0,15
immun	1:100	0,55	0,19
Puffer A	--	0,03	0,01

Beispiel 4

Herstellung von polyklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein) in Kaninchen

a) Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung

Für das zweite Fallbeispiel wurde der ubiquitär aktive Promotor des Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α)-Gens zur Expressionssteuerung verwendet. Der verwendete Expressionsvektor basiert auf dem pBluescript-Vektor (Stratagene, Heidelberg), in den ein 1,2 kb Fragment des humanen EF-1 α -Genpromotors, ein 0,7 kb *EcoRI*-Fragment mit dem Polyadenylierungssignal der humanen G-CSF-cDNA (Mizushima und Nagata, 1990), sowie zwischen die *Bam*HI/*Not*I-Schnittstellen die für das Influenzavirus Hämagglutinin (HA)-tag-kodierende Oligonukleotidsequenz eingebaut wurden. In die *Cla*I/*Bam*HI-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne des Aktivinrezeptors IIA kodierende cDNA-Bereich des Menschen (431 bp; 135 Aminosäuren) so einkloniert, daß am 3'-Ende die HA-tag-kodierende Region und ein nachfolgendes Stopkodon zu liegen kam (pEF-1 α -ActRII-HA).

b) Genetische Immunisierung von Kaninchen

Es wurden zur genetischen Immunisierung 100 µg pEF-1α-ActRII-HA-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zwei Kaninchen (Chinchilla Bastard; Charles River, Sulzfeld) wurden nach Narkotisierung mit 50 mg/kg Pentobarbital und Enthaarung von 200 cm² Bauchfell mit Enthaarungscreme dreissigmal mit der *gene gun* beschossen. Pro "Schuß" wurden 1 µg Plamid-DNA-Gemisch appliziert. Nach 21 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 21 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

Beispiel 5

Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins

Die Herstellung des vom Expressionsplasmid pEF-1α-ActRII-HA kodierten Proteins durch transiente Transfektion von BOSC23-Zellen erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 6

Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt-kodierte Proteins gerichtet sind

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten HA-tag-Protein (EF-1α-ActRII-HA) an Mikrotiterplatten wurden die Vertiefungen zunächst mit dem F(ab)₂-Fragment des anti-HA-tag-Antikörper beschichtet. Dazu wurden 150 µl des Antikörperfragments je Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und freie Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl 0,2% BSA/PBS blockiert.

Anschließend wurde der Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe Beispiel 5) bzw. eines *mock-*

transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann dreimal mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Die Präimmun- und Immunsereen der immunisierten Kaninchen wurden 1:100 bzw. 1:500 mit 0,2% BSA/PBS verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Kaninchensereen wurden in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 1:2000 mit PBS/0,2% BSA verdünnten Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen, mit je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und in einem ELISA-reader gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren auch in Kaninchen spezifische polyklonale Antikörper gegen ein unbekanntes Genprodukt erzeugt werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und
- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt a) verwendete Vektor am C-Terminus der für das Polypeptid kodierenden DNA eine Sequenz aufweist, die für das Auffindungssignal kodiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffindungssequenz ausgewählt ist aus der His₆-tag-Sequenz, der Hämagglutinin-Sequenz eines Influenzavirus oder der myc-tag-Sequenz.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am C-terminalen Ende der Auffindungssequenz eine Polyadenylierungssequenz aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am 5'-Ende der für das Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz einen starken Promotor aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der starke Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus starken eukaryotischen Promotoren, insbesondere dem Promotor des Elongationsfaktors 1 α oder des Cytomegalovirus-Promotors.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA, die gemäß Schritt b) direkt in ein Tier eingebracht wird in einem Vektor vorliegt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA in Schritt b) mit Hilfe einer gene gun in das Tier eingebracht wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem in Schritt b) eingesetzten Tier um eine Maus, eine Ratte oder ein Kaninchen handelt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) zusätzlich zu der für das Polypeptid kodierenden DNA ein genetisches Adjuvans appliziert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das genetische Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Zytokinexpressionsvektoren, die die Antikörperproduktion erhöhen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß geeignete Zellen eines gemäß Schritt b) immunisierten Tieres für die Herstellung von

Hybridomazellen zur Bildung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt a) gebildete Polypeptid durch Bindung des Auffindungssignals an einen hiergegen gerichteten Antikörper oder ein Antikörperfragment an eine feste Phase gebunden wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der festen Phase um Mikrotiterplatten, Gelkügelchen oder magnetische Kügelchen handelt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt b) gebildete Antikörper nach Bindung an das in Schritt a) gebildete Polypeptid mit Hilfe eines gegen den Antikörper gerichteten Anti-Antikörpers nachgewiesen wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt c) an das exprimierte Polypeptid gebundene Antikörper durch Elution freigesetzt wird.

17. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er nach einem der Verfahren gemäß Anspruch 1-17 erhältlich ist.

Zusammenfassung

Offenbart wird ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und
- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.